

ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ  
ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,  
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ ПРИ МСХ СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ  
В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

Часть XI

Москва - 1981

**Государственная комиссия по химическим средствам борьбы  
вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ  
В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ**

**Часть XI-я**

**Данные методики апробированы и рекомендованы  
в качестве официальных группой экспертов при  
Госкомиссии по химическим средствам борьбы с  
вредителями, болезнями растений и сорняками  
при МСХ СССР**

**Москва - 1981**

Настоящие методические указания предназначены для санитарно-эпидемиологических станций и научно-исследовательских учреждений Минздрава СССР, а также ветеринарных, агрохимических, контрольно-токсикологических лабораторий Минсельхоза СССР и лабораторий других Министерств и ведомств, занимающихся анализом остаточных количеств пестицидов и биопрепаратов в продуктах питания, кормах и внешней среде.

Методические указания апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР. (Председатель группы экспертов М.А.Клисенко).

Методические указания согласованы и одобрены отделом перспективного планирования санэпидслужбы ИМПитМ им.Е.И.Марциновского и лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР.

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного  
Государственного санитарного  
врача СССР А.И. Заиченко

28 января 1960г. № 2123-80

Методические указания по определению  
полиэдров вируса ядерного полиэдроза  
капустной совки на растительных объектах  
иммунофлуоресцентным методом

Настоящие методические указания распространяются на определение содержания полиэдров инсектицида вириин-ЭКС на растительных объектах при санитарном контроле, а также для научно-исследовательской работы.

I. Характеристика анализируемого инсектицида

I.1. Вириин-ЭКС - вирусный энтомопатогенный препарат - вирусный инсектицид. Предназначается для борьбы с гусеницами капустной совки на капусте, сахарной свекле и других сельскохозяйственных культурах. Действующим началом препарата является вирус ядерного полиэдроза, относящийся к группе бакуловирусов. В препарате вирус находится в виде вирионов, заключенных в полиэдры / многогранники /, представляющие собой кристаллизованный кремне содержащий белок. Внутри каждого полиэдра заключено 10-20 вирионов. Размеры полиэдров 0,5-5 мк. Препарат представляет собой суспензию полиэдров в 50% глицерине. Препарат содержит не менее  $1 \times 10^9$  полиэдров в мл. Применяется путем опрыскивания сельскохозяйственных культур, повреждаемых капустной совкой. Обработку проводят любым опрыскивателем против гусениц всех возрастов. Расход препарата - 100 мл/га. Перед опрыскиванием

в рабочую суспензию добавляют поверхностно активное вещество ОП-7 в конечной концентрации 0,006 - 0,04%.

### 1.2. Физические и химические свойства.

Вирин-ЗКС - суспензия серого цвета в 50% глицерине. Влажность - 96-98%, pH 6,8-7. Выпускается в жидкой форме или в порошковой форме с наполнителем глиной и титром  $1 \times 10^9$  полиэдров в гр.

### 1.3. Токсикологическая характеристика.

Медико-токсикологические исследования, проведенные в КНИИЗМП, показали, что действующее начало препарата - вирус ядерного полиэдроза - при введении в организм экспериментальных животных всеми известными путями не репродуцируется и не вызывает скрытой или явной инфекции.

Вирус не репродуцируется в культурах клеток позвоночных. Препарат и его активное начало не могут вызывать инфекционное заражение людей, домашних или диких животных.

Препаративные формы инсектицидов /сухие и жидкие/ не токсичны для человека и теплокровных животных при однократном и множественном воздействии различными путями. В связи низкой токсичностью ЛД<sub>50</sub> для крыс и мышей не определяется. Токсическая доза для куриного эмбриона -  $0,5 \times 10^8$  полиэдров на эмбрион. В эксперименте показано, что вирин-ЗКС является слабым аллергеном, может оказывать неспецифическое аллергизирующее действие, как и другие белоксодержащие продукты микробного происхождения. Рекомендована ПДК в воде рыбохозяйственных водоемов 1 мг/л /Прокопенко В.А., 1978/.

## 2. Методика определения полиэдров вирин-ЗКС на растительных объектах иммунофлуоресцентным методом

### 2.1. Основные положения.

Метод определения остаточных количеств вирин-ЗКС во внешней среде является модификацией известного метода Кунса /1941/, при-

няемого в медицинской вирусологии. Используется непрямой вариант метода Кунаса. Определение остаточных количеств препарата во внешней среде проводится не по вирионам, а по полидрам в связи с тем, что вирусные частицы весьма лабильны и легко разрушаются во внешней среде под влиянием различных факторов.

При условии централизованного изготовления иммунных антиполидренных сывороток иммунофлуоресцентный метод является экспресс-методом, высокочувствительным и специфичным.

#### 2.1.1. Принцип метода.

В основе метода лежит специфическая реакция взаимодействия антигена /в данном случае полидров/ с антителами, мечеными флуоресцирующим красителем /ФИТЦ/. Реакция выявляется в виде специфического свечения при наблюдении в люминесцентном микроскопе - ярко-зеленое свечение оболочка полидров.

#### 2.1.2. Метрологическая характеристика метода.

Данным методом можно определить количество полидров в диапазоне от  $0,5 \times 10^2$  до  $1 \times 10^{11}$  полидров в 1 мл.

#### 2.1.3. Избирательность метода.

Метод высокочувствительный и специфичный. Способен дифференцировать различные виды полидров. Чувствительность метода в большой степени зависит от качества приготовленных гипериммунных сывороток.

#### 2.2. Реактивы и материалы.

Для проведения анализа необходимы реактивы, которые обычно имеются в вирусологической лаборатории, где ведутся исследования с люминесцентным микроскопом. К ним относятся:

- 1) ацетон
- 2) физиологический раствор /рН 7,1-7,2/
- 3) спирт этиловый
- 4) нефлуоресцирующее иммерсионное масло

5) сахара

6) антибиотики: пенициллин, стрептомицин, нистатин

7) мертвые

Специфическими ингредиентами в данной методике являются:

а) сыворотка Званса, б) меченая изотопом флуоресцеина ослиная сыворотка против глобулинов кролика /изготавливаемая в г.Москва в Институте эпидемиологии и микробиологии им.Гамалеи/ ив) специфическая антиполиэдренная кроличья сыворотка.

Поскольку централизованное производство антиполиэдренных сывороток еще не налажено, необходимо изготавливать сыворотки в лабораторных условиях. Схема иммунизации кроликов полиэдрами описана нами в сборнике № 10 "Методических указаний по определению микробиологических пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде" на примере вирион-ЭНШ и может быть применена для получения антиполиэдренной сыворотки к вирусу ядерного полиэдроза капустной совки. Материалом для иммунизации служит взвесь очищенных полиэдров капустной совки, извлеченных из препарата методом дифференциального центрифугирования и разделения в градиенте плотности сахарозы, как описано на примере вирион-ЭНШ в сборнике № 10.

### 2.3. Приборы, аппаратура, посуда.

- |                                  |                             |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 1) люминесцентный микроскоп      | 10) пробирки бактериологич. |
| 2) окулярная сетка               | 11) чашки Петри             |
| 3) объект-микроскоп              | 12) предметные стекла       |
| 4) камера Горяева                | 13) пипетки пастеровские    |
| 5) центрифуга / до 5000 об/мин / | 14) пипетки мерные          |
| 6) термостат / 37°C /            | 15) цилиндры стеклянные.    |
| 7) pH-метр                       |                             |
| 8) мембранные фильтры № 2,3      |                             |
| 9) фильтр Сейтца                 |                             |

## 2.4. Подготовка к определению.

При отсутствии централизованного изготовления специфических иммунных антиполиэдренных сывороток основная подготовительная работа сводится к приготовлению этих сывороток в лабораторных условиях.

Следующим подготовительным этапом является отбор проб, их подготовка и хранение. Описание приводится в пункте 2.5.

Накануне исследования следует отъюстировать микроскоп, установить фильтры.

Для проведения подсчета полиэдров в исследуемом объеме по формуле, приводимой в пункте 2.7, необходимо определить площадь квадрата окулярной сетки  $/S/$  с помощью объект-микрометра, помещенного на предметный столик микроскопа вместо препарата. Определяют сторону квадрата окулярной сетки. При отсутствии окулярной сетки определяют с помощью объект-микрометра диаметр поля зрения и вычисляют  $S$  по формуле:  $S = \pi R^2$ .

## 2.5. Отбор проб.

После обработки сельскохозяйственных культур вирусными инсектицидами вирионы и полиэдры не проникают внутрь растений. Они могут находиться только на поверхности растительных объектов.

Для взятия проб с поверхности растительных объектов / листья, плоды / нужно заготовить заранее марлевые салфетки 5x5 см. Уложить их в чашки Петри или бумажные пакеты и простерилизовать; в таком виде они могут долго храниться. С помощью таких салфеток можно брать пробы методом смыва / протираania / влажной салфеткой более или менее гладкой поверхности растения / головки капусты, листьев капусты, свеклы / порядка 100 см<sup>2</sup>. Для этого пинцетом берут салфетку, смачивают в стерильном физиологическом растворе /рН 7,4-7,6/, кончик отжимают и тщательно протирают исследуемую площадь. Затем

салфетку переносят в колбочку с физиологическим раствором / 100мл/. Энергично встрикивают 3-5 минут, салфетку отжимают пинцетом и удаляют.

При исследовании неровных поверхностей / ягоды, фрукты, плоды/ или поверхностей мелких объектов /травы/ делают нарезки исследуемых объектов, заготавливают ими трафарет с площадью 100 см<sup>2</sup>. Общая площадь нарезки будет равняться 100 см<sup>2</sup>. Затем измельченные нарезки помещают в колбы с физиологическим раствором /рН 7,4-7,6/ и ставят на магнитную мешалку на 10-15 минут.

Пробы фильтруют через три слоя марли для удаления грубых частиц, а затем пропускают через фильтр Зейтца с мембранными пластинками №2 или №3 с помощью вакуумного насоса. По окончании фильтрации фильтр подсушивают на фильтровальной бумаге при +40°С. Пробы собирают в количестве не меньше 6 в различных точках исследуемого участка в зависимости от целей исследований.

## 2.6. Проведение определения.

Исследованиям подвергаются мембранные фильтры, через которые были пропущены полученные пробы /смывы с растительных объектов/.

Фильтр переносят на обезжиренное предметное стекло лицевой стороной /осадком/ кверху. Стекло с фильтром помещают в чашку Петри на две стеклянные палочки. На фильтр пипеткой осторожно наливают ацетон. Фильтр обесцвечивается, и препарат фиксируется к стеклу. Препарат подсушивают до полного испарения ацетона /образовавшаяся пленка должна быть прозрачна/. Для устранения неспецифического связывания препарат обрабатывают синькой Эванса, водный раствор которой в разведении 1:10000 наносят на препарат. Время обработки зависит от типа пробы и составляет от 1 до 15 минут. Препарат промывают в проточной воде, подсушивают на воздухе. Препарат должен иметь слабо-

голубую окраску. На высушенный препарат наносят иммунную кроличью сыворотку против полиэдров капустной совки, предварительно разведенную 1:10 физиологическим раствором. Помещают в термостат во влажной камере /чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне/ при 37°C на 15-20 минут. Затем сыворотку смывают проточной водой 2 минуты, препарат подсушивают на воздухе, после чего на препарат наносят ослиную антикроличью меченую ФИТЦ сыворотку в рабочем разведении, указанном на ампуле. Снова выдерживают в термостате при 37°C 15-20 минут с последующим промыванием в проточной воде.

После подсушивания препарат готов к просмотру. Просмотр можно проводить в любом люминесцентном микроскопе, а также в обычном световом с применением опак-иллюминатора и люминесцентной установки ОИ-17, ОИ-18. Изложенный метод окраски позволяет выявить даже единичные полиэдры по их специфическому свечению. Ободок полиэдров имеет ярко-зеленое свечение на общем красноватом фоне препарата.

Контролям служат: а) препараты, приготовленные по той же схеме, но без обработки специфической сывороткой; б) препараты, приготовленные из проб, взятых на необработанных участках. Контрольные препараты специфического свечения не имеют.

## 2.7. Обработка результатов анализа.

Предлагаемый метод позволяет сделать качественное, а также количественное заключение о загрязненности вирусными инсектицидами растительных объектов. Для количественного анализа производят подсчет полиэдров на фильтрах по формуле:  $M = \frac{2 \cdot S \cdot 10^6}{S \cdot V}$ , где

M - число полиэдров в объеме исходной суспензии;

a - среднее число полиэдров в одном квадрате окулярной сетки;

S - площадь квадрата окулярной сетки в мм<sup>2</sup> /площадь поля зрения/;

$2 \cdot 10^6$  - площадь мембранного фильтра в мм<sup>2</sup> /переводный коэффициент

в  $\text{мм}^2 \cdot 10^6$ ;

$V$  - объем профильтрованной суспензии.

Для более точного подсчета числа полиэдров в квадрате окулярной сетки проводят подсчет по 32 квадратам на 3 различных участках фильтра при общем числе подсчитанных полиэдров не меньше 600. Затем вычисляем среднее арифметическое значение  $a$ . Определение площади квадрата окулярной сетки описано в пункте 2.4.

Пример: число полиэдров в 32 квадратах при первом подсчете составило 420, при втором - 395, при третьем - 427. Вычисляем:

$$a = \frac{420 + 395 + 427}{32 \times 3} = 13$$

$S = 0,041 \text{ мм}^2$  - площадь поля зрения /определили по объект-микрометру/

$$S_1 = \pi R^2 = 3,14 \times 17,5^2 = 961,6$$

$V = 500 \text{ мл}$

$$n = \frac{13 \times 961,6 \times 10^6}{0,041 \times 500} = \frac{125008 \times 10^6}{20,5} = 6,1 \times 10^6 \text{ полиэдров на 1 мл}$$

### 3. Требования безопасности.

Поскольку препарат вирион-ЗКС не токсичен и не инфекционен для человека в рекомендуемых нормах, то при работе по санитарно-гигиеническому контролю соблюдаются меры безопасности такие, как при работе с мало токсичными веществами. При работе с препаратом необходимо иметь индивидуальные средства для защиты органов дыхания - респиратор "лепесток" ШБ-1. Для защиты рук необходимы резиновые перчатки ГОСТ 9502-60.

К работе с препаратом не допускаются лица со склонностью к аллергическим заболеваниям. По окончании работы рекомендуется прополоскать полость рта содовым раствором. Лица, контактирующие с препаратом, периодически подвергаются осмотру - 1 раз в 12 месяцев

/ Приказ Минздрава СССР от 30 мая 1969 г., № 400 /

#### 4. Литература

1. Гулий В.В., Годосова М.А. Вирусы в защите леса от вредных насекомых. М., "Лесная промышленность", 1975.
2. Сидоренко Г.И. Методы санитарно-микробиологического исследования объектов окружающей среды. М., "Медицина", 1978.

Исполнители: Киевский НИИ эпидемиологии, микробиологии и паразитологии ИЗ УССР / Трусов В.И., Васильева В.Л./

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

Отр.

### Хлорсодержащие пестициды

1. Методические указания по определению неорона в меде методом газовой хроматографии . . . . .	I
2. Методические указания по определению нитрохлора и префорана в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газожидкостной хроматографии . . . . .	8
3. Методические указания по определению ЭФ-2 в воде и почве газожидкостной хроматографией . . . . .	14
4. Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях хроматографией в тонком слое . .	22
5. Методические указания по определению полихлорированных бифенилов в присутствии хлорорганических пестицидов в птицепродуктах методом газовой хроматографии . . . . .	45

### Фосфорсодержащие пестициды

1. Методические указания по определению остаточных количеств волексона в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией .	52
2. Методические указания по определению остаточных количеств гетерофоса в овощных культурах, почве и воздухе методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии . . . . .	6I
3. Методические указания по определению остаточных количеств дуробана в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией .	67
4. Методические указания по определению остаточных количеств изофоса-3 в рисе, почве и воде газожидкостной и тонкослойной хроматографией . . . . .	75
5. Методические указания по определению метилнитрофоса и динитрооксона в зерне и продуктах переработки зерна хромато-элюизмом и газохроматографическим методом . . . . .	84

	Стр.
6. Методические указания по определению остаточных количеств рицида "П" в рисе и воде газожидкостной хроматографией . . . . .	93
7. Методические указания по определению метилнитрофоса, фенитрооксона и п-нитрокрезола в зерне и продуктах переработки зерна методом хроматографии в тонком слое . . . . .	103
8. Энзимно-хроматографический метод определения фосфорорганических пестицидов в растительных продуктах и биосубстратах . . . . .	109

#### Азотсодержащие пестициды

##### **1. Производные мочевины, гуанидина, дитиокарбаминовой кислоты, анилиды карбоновых кислот, нитропроизводные, дитиокарбаты**

1. Методические указания по определению дуала в растительном материале, почве и воде хроматографией в тонком слое . . . . .	118
2. Методические указания по определению остаточных количеств гербицида малорана в почвах с различным содержанием гумуса методом ТСХ . . . . .	124
3. Методические указания по определению остаточных количеств НЕ-166 в огурцах хроматографией в тонком слое и фотометрическим методом . . . . .	129
4. Методические указания по определению остаточных количеств тендкса в воде и почве . . . . .	136
5. Методические указания по определению ФДН (N',N'-диметил-N-(3-хлорфенил)-гуанидина) в огурцах и воде методом тонкослойной хроматографии . . . . .	139
6. Методические указания по определению дитена М-45 в продуктах питания растительного происхождения и воде . . . . .	149

##### **II. Гетероциклические соединения**

7. Методические указания по определению базаграна в воде, почве, зерне и растительном материале . . . .	152
---	-----

	Стр.
8. Методические указания по определению фунгицида бай-летона методом ТСХ в почве, корнях, зеленых листьях, плодах томатов и огурцов . . . . .	159
9. Методические указания по газожидкостно-хроматографическому определению бентазона в почве и растениях . . . . .	166
10. Методические указания по определению диквата в семенах подсолнечника и масле из семян подсолнечника спектрофотометрическим методом . . . . .	174
11. Методические указания по определению метазина в воде, почве, овощах и биологическом материале методом хроматографии в тонком слое сорбента . . . . .	181
12. Методические указания по определению остаточных количеств симм-триазиновых гербицидов (симезина, атразина, пропазина, прометрина, семазона, мезорантала, метазина, метопротрина) в почве газожидкостной хроматографией . . . . .	188
13. Методические указания по определению кетофора в семенах хлопчатника методом хроматографии в тонком слое . . . . .	198
14. Методические указания по определению ронстар (оксидизона) в рисе методами газовой и тонкослойной хроматографии . . . . .	205
15. Методические указания по определению тагигарена в воде методом тонкослойной хроматографии . . . . .	209
16. Методические указания по определению тербацила в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газожидкостной хроматографии . . . . .	214
17. Методические указания по определению трифторина в воде . . . . .	220
18. Методические указания по определению остаточных количеств текто(тиабендазола) в картофеле и свекле тонкослойной хроматографией . . . . .	227
19. Методические указания по определению остаточных количеств феназона в почве, воде, свекле и растительных объектах газожидкостной хроматографией . . . . .	234

### Прочие пестициды

1. Методические указания по определению остаточных количеств хлората магния полярографическим методом ... 243
2. Методические указания по определению нортрона в воде, черноземной почве и сахарной свекле ..... 248
3. Методические указания по определению содержания общей ртути в мясе, яйцах, рыбе, молочных продуктах, почве ..... 255

### Бактериальные пестициды

1. Методические указания по определению микробиологических инсектицидов не прямым иммунофлюоресцентным методом ..... 268
2. Методические указания по определению витамина А в воздухе методом тонкослойной хроматографии ..... 276
3. Методические указания по определению полиэдров вируса ядерного полиэдроза капустной совки на растительных объектах иммунофлюоресцентным методом ..... 280

### Дополнения

1. Хроматографическое определение микроколичеств гропанида, линурона, монолинурона и их метаболитов в воде, почве и растительном материале ..... 289
2. Методические указания по определению актеллика растительной продукции, почве и воде ..... 296